

博士(農学) チャヤボーン サランプルティ

学位論文題名

Characterization and Purification of Lepidimoide-Producing Enzymes from *Colletotrichum* sp. AHU9748

(*Colletotrichum* sp. AHU9748 由来レピジモイド生産酵素の精製とその特徴)

学位論文内容の要旨

レピジモイド (Lp) は発芽したクレスの種や他の植物成分から抽出されるアレロパシー物質(感化物質)である。植物の成長・発育に及ぼす様々な影響やその化学合成については報告されているが、Lp生産に関わる酵素についての報告は未だない。当研究室では、副産物(エピマー)の生成を伴い化学試薬を大量に使用した複雑なステップからなる化学合成ではなく、単純にオクラ多糖を微生物分解することによりLp生産を効果的に行うことを考え、分離保存した植物内生菌からスクリーニングによって *Colletotrichum* 属真菌 AHU9748 株を得た。オクラの粘性物質に含まれる多糖から本菌株によって生産されるオリゴ糖は、MS, NMRなど物理化学的測定によりLpであることが明らかにされた。そのアレロパシー効果や、様々な植物及び他の生物に対する作用機構の解明、生物学的制御資材としての可能性を追求する上で、Lpの大量生産は必須の課題である。さらに、Lp生産微生物酵素の特徴を明らかにし、生成プロセスを解析することは、大量生産だけでなく、植物内生菌が病害を表すことなく植物組織に侵入するための戦略を理解する上で重要である。本研究では、オクラ多糖からのLp生産に必要とされる *Colletotrichum* sp. AHU9748 株由来の酵素を精製後、酵素の特徴を明らかにし、Lpの生成機構を解明すると共に効果的な微生物によるLpの生産を目的とした。

1. 使用したオクラ多糖は、*Abelmoschus esculentus*, Moench の未熟な実の粘性物質から友田らの方法に従い抽出された。オクラ多糖の主鎖を作る六糖から成る繰り返し構造は、Rhamnose の 4 位に 4-O-β-D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、(α1→4) GalA (α1→2) Rha の繰り返し構造を持つと言われている。ラムノース、ペクチン、キシランなどを誘導物質あるいは基質としてLp生産を調べた結果、ペクチンから多少Lp生産酵素が誘導され、またオクラ多糖から誘導された酵素によりペクチンからも少量のLp様物質が生成されたが、Lp生産のための酵素誘導物質としてまた基質としてオクラ多糖が最適であった。

2. Lp生産酵素は、0.25%オクラ多糖を单一炭素源し、この菌株を 60 時間培養した後に誘導された。粗酵素によるLp生成反応の至適pH及び温度はそれぞれ 5.0-7.0, 30-40°C であった。*Colletotrichum* sp. AHU9748 株のオクラ多糖誘導粗酵素を用いた酵素反応では、オクラ多糖から 2 時間以内にLp生産を開始し、その後 16 時間後まで生産量が増加しその後は定常状態となった。Lp生産は、培養上清

と菌体の両方から調製された粗酵素で可能であったが、その生産量は上清からの粗酵素で非常に多かった。またpH3 からpH10 の間で粗酵素のLp生産活性安定性を調べた結果、3.0 及び 6.0 で不安定であったため、酵素精製はpH8.0 の緩衝液と4°Cで行われた。

3. 最初の精製で、オクラ多糖からのLp生産には 2 つ以上の酵素が関与することが予測された。これらの酵素を決めるため、Lpの生産量と共に、オクラ多糖の構造からLp産生に必要と我々が予想した β -galactosidase (β -gal)、rhamnogalacturonan lyase (RG-lyase)、acetylesterase (AE)活性を測定しながら、培養上清を硫酸沈殿後、カラムクロマトグラフィーにより分画し、Resource Q カラムから連続して分画された、Lpを最も多く生産する画分とわずかに生産する画分及び非生産画分を得た。Lpを最も多く生産する画分には β -gal、RG-lyase、AE 活性が共に見られたが、非生産画分では高生産画分に比べ β -gal、RG-lyase 活性が低かった。Lpを生産する画分から SDS-PAGE 上で分離した 3 個のタンパク質のN末端アミノ酸配列を読み、その相同配列をデータベース上で検索したところ、Lp生産画分に β -gal、RG-lyase、AE が存在することを裏付ける結果となった。

4. オクラ多糖で誘導された培養上清からカラムクロマトグラフィーにより RG-lyase と AE を精製した。得られた RG-lyase と AE のうち RG-lyase のみをそれぞれ、Resource Q カラムから得られた Lp 非生産画分とわずかに Lp を生産する画分に加えた所、RG-lyase、 β -gal 活性が共に低い Lp 非生産画分では Lp を生産せず、Lp 生産が最も高い画分に比べ RG-lyase 活性のみが低くわずかに Lp を生産した画分では、その生産性が 5 倍になった。これらの結果から RG-lyase と β -gal 活性が共に Lp 生産には必須であることが明らかとなった。しかし、わずかな Lp 生産画分には、SDS-PAGE 上で分離される 85 kDa のタンパク質も存在せず、RG-lyase 添加後も Lp 生産は高 Lp 生産画分の生産量に匹敵するものではなかった。高 Lp 生産画分にさらに精製 RG-lyase を加えたが、著しい Lp 生産の上昇は見られなかった。これらの結果から、Resource Q カラムで分画された高 Lp 生産画分に含まれかつ SDS-PAGE 上で分離される 85 kDa の未同定タンパク質が、 β -gal、RG-lyase、AE のほかに、Lp 生産の最初か最後の段階で重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

5. Fry ら(1993)は、 $^{4'}\text{-GalA-(1}\rightarrow 2\text{)-Rha-(1}\rightarrow$ の繰り返し構造を持った rhamnogalacturonan のようなペクチン多糖の分解によりニ糖類 $\Delta\text{GalA-(1}\rightarrow 2\text{)-Rha}$ を得るためにには lyase や endorhamnosidase が必要であろうと推測していた。オクラ多糖のように主鎖を作る六糖繰り返し構造に 4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、中に(α 1→4) GalA (α 1→2) Rha, がある場合、これを基質として Lp を生成するためには β -gal も重要であることを我々は実験的に明らかにした。

最後に、これらの実験結果から、Lp 生産のための微生物酵素として、 β -gal と RG-lyase や AE などの rhamnogalacturonan 分解酵素が重要であると結論付けた。先の吉村の実験では 50 株の植物内生菌と 8 株の植物内生細菌中 29 株の真菌が、オクラ多糖から多かれ少なかれ Lp 様ニ糖類を産生することが明らかになっている。これらの結果は、植物内生菌が植物の細胞物質から植物ホルモンのように振舞うニ糖類を比較的高頻度で生産する事を示唆した。Lp 生産画分にさらに RG-lyase だけを加えても、著しい Lp 生産の向上は見られなかったが、これらの結果が微生物酵素によるより効果的な Lp 大量生産に貢献することを期待してやまない。

学位論文審査の要旨

主査 教授 浅野 行蔵
副査 教授 木村 淳夫
副査 講師 曾根輝雄

学位論文題名

Characterization and Purification of Lepidimoide-Producing Enzymes from *Colletotrichum* sp. AHU9748

(*Colletotrichum* sp. AHU9748 由来レピジモイド生産酵素の精製とその特徴)

本論文は英文 105 頁、図 31、表 11、9 章からなり、参考論文 3 編が付されている。

レピジモイド (L p) は発芽したクレスの種などから抽出されるアレロパシー物質である。植物の成長・発育に及ぼす様々な影響やその化学合成については報告されているが、L p 生産に関わる酵素についての報告は未だない。当研究室では、オクラ多糖の微生物分解により L p を生産することを考え、東南アジアの植物内生菌から *Colletotrichum* 属真菌 AHU9748 株を選抜した。オクラの粘性物質に含まれる多糖から本菌株によって生産されるオリゴ糖は、MS、NMR など物理化学的測定により L p であることが確かめられた。その、アレロパシー効果、作用機構の解明や生物資材としての可能性を追求する上で、L p の大量生産は必須の課題である。さらに、L p 生産微生物酵素の特徴を明らかにし、生成プロセスを解析することは、植物内生菌が、病徵を表すことなく植物組織に侵入するための戦略を理解する上でも重要である。本研究では、オクラ多糖からの L p 生産に必要とされる *Colletotrichum* sp. AHU9748 株由來の酵素を精製後、酵素の特徴を明らかにし、L p 生成機構の解明を目的とした。

1. 使用したオクラ多糖は *Abelmoschus esculentus*, Moench の未熟な実の粘性物質から友田らの方法に従い抽出された。オクラ多糖主鎖の六糖から成る繰り返し構造は、Rhamnose の 4 位に 4-O-β-D-galactopyranosyl-D-galactopyranose を側鎖として持ち、(α1→4) GalA (α1→2) Rha の繰り返しがあると言われている。L p 生産酵素は、0.25% オクラ多糖を单一炭素源し、この菌株を 60 時間培養した後に誘導され、基質としてもオクラ多糖が最適であった。粗酵素による L p 生成反応の至適 pH 及び温度はそれぞれ 5.0-7.0, 30-40°C であった。*Colletotrichum* sp. AHU9748 株の誘導粗酵素を用いた酵素反応では、オクラ多糖

からのL p生産量が16時間後まで増加し、その後は定常状態となった。L p生産は上清の方が多いpH3.0及び6.0で不安定であったため、酵素精製はpH8.0、4°Cで行われた。

2. 最初の精製で、オクラ多糖からのL p生産には2つ以上の酵素が関与するのだろうと予測された。これらの酵素を決めるため、L pの生産量と共に、オクラ多糖の構造からL p産生に必要と予想される、 β -galactosidase (β -gal)、rhamnogalacturonan lyase (RG-lyase)、acetylersterase (AE)活性を測定しながら、培養上清を硫安沈殿後、カラムクロマトグラフィーを行った。Butyl Sepharose及びQ Sepharoseカラムで溶出されたL p活性画分では、高い β -gal、RG-lyase、AE活性を伴った。最終的に、Resource QカラムからL pを最も多く生産する画分と、わずかに生産する画分及び非生産画分を連続的に得た。L pを最も多く生産する画分には、高い β -gal、RG-lyase、AE活性が共に見られたが、非生産画分では高生産画分に比べ β -gal、RG-lyase活性が低かった。L pを生産する画分からSDS-PAGE上で分離した3個のタンパク質のN末端アミノ酸配列を読み、その相同配列をデータベース上で検索したところ、L p生産画分に β -gal、RG-lyase、AEが存在することを裏付ける結果となった。

3. オクラ多糖で誘導された培養上清からRG-lyaseとAEを精製した。得られたRG-lyaseをRG-lyase、 β -gal活性が共に低いL p非生産画分に加えてもL pを生産しなかった。L p生産が最も高い画分に比べ、RG-lyase活性のみが低くわずかにL pを生産する画分にRG-lyaseを加えると、L p生産は5倍に上昇した。これらの結果からRG-lyaseと β -gal活性が共に、L p生産には必須であることが明らかとなった。しかし、RG-lyase添加後のL p生産は、高L p生産画分に匹敵するものではないことから、このRG-lyaseが、繰り返し構造中のすべてのrhamnogalacturonan (RG)間の1, 4結合を β -eliminationを伴って加水分解するのではないかと考えられた。末端のrhamnoseを切り離す加水分解酵素などのような他の酵素も必要と思われた。Resource Qカラムで分画された高L p生産画分に含まれ、かつSDS-PAGE上で分離される85kDaの未同定タンパク質が、 β -gal、RG-lyase、AEのほかに、L p生産の最後の段階で重要な役割を果たしている可能性がある。

以上、本研究では、オクラ多糖のように4-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactopyranoseを側鎖として持つRGを基質とし、*Colletotrichum* sp. AHU9748株由来の微生物酵素を利用して、L pを生成するための条件を検討し、さらには、 β -galと、RG-lyaseやAEなどのRG分解酵素、及び未同定の85kDaのタンパク質が重要であることを明らかにした。RGの脱アセチル化はその後の主鎖の加水分解には必須であることが報告されている。予測される酵素反応として、まず、AEとRG-lyaseがオクラ多糖にはたらき、いくつかのRG小断片にした後、 β -galや他の未同定の酵素が、これらの断片からL pを切りだすのではないかと考えた。これらの成果は微生物酵素によるより効果的なL p生産や、植物内生菌の侵入・共生戦略の理解に大きく寄与するものと思われる。

よって審査員一同は、サランプルテー・チャヤポーンが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。